

09/937649

## IN THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE (RO/US)

Designated/Elected Office (DO/EO/US)

U.S. National Phase of

International Application No.: PCT/EP00/02910

International Filing Date: 31 March 2000

Priority Date Claimed: 01 April 1999

Applicants:

Johannes Gerdes, Thomas Scholzen, Elmar Endl,  
Claudia Wohlenberg, Bettina Baron-Luhr, Margrit  
Hahn, Patricia Prilla, Johanna Szuwinski and  
Rolf Knippers

Title:

MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST HUMAN PROTEIN  
MCM3, PROCESS FOR THEIR PRODUCTION, AND  
THEIR USE

Attorney's Docket No.:

3276.1000000

DATE: 27 September 2001EXPRESS MAIL NO. EL762235141US



EP 00/02910  
**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 18 MAY 2000

WIPO PCT

## Bescheinigung

Die Anmelderin Forschungszentrum Borstel in Borstel b Bad Oldesloe/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Monoklonale Antikörper gegen das humane Mcm3 Protein,  
Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung"

am 1. April 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 07 K, A 61 K und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 28. April 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 199 15 057.5

Faust

Forschungszentrum Borstel, Parkallee 1-40, 23845 Borstel

Monoklonale Antikörper gegen das humane Mcm3 Protein, Verfahren zu Ihrer Herstellung und Ihre Verwendung

## Beschreibung

### Technisches Gebiet

Die vorliegende Erfindung betrifft monoklonale Antikörper gegen das humane Mcm3 Protein, Verfahren zu Ihrer Herstellung und Ihre Verwendung.

### Stand der Technik

Mcm Proteine wurden zuerst in der Bierhefe *S. cerevisiae* beschrieben. Es ist bekannt, daß diese Proteine eine wichtige Rolle bei der Initiation der DNA-Replikation spielen, was in der Hefe durch Ihre entscheidende Rolle bei der Weitergabe von extrachromosomalen DNA-Abschnitten, Minichromosomen, gezeigt wurde (Maine et al., Genetics, 1984, 106:365-385). Diese Eigenschaft war namensgebend für diese Proteine, Minichromosome maintenance, Mcm. Die Proteine der Mcm-Familie sind evolutiv hoch konserviert.

Im humanen System sind derzeit sechs Proteine (Mcm2, Mcm3, Mcm4, Mcm5, Mcm6, Mcm7) beschrieben, die mit anderen Zellzyklus-abhängigen Strukturen einen Proteinkomplex ausbilden, der für die DNA-Replikation benötigt wird und die schon von J. J. Blow und R. A. Laskey 1988 (Nature, 332:546-548) als DNA-Replikations-Lizenzfaktoren postuliert worden waren. Dem Mcm3 Protein kommt eine wichtige Rolle dadurch zu, daß es eine biochemisch feste Bindung mit dem Mcm5 eingeht

(A. Richter, R. Knippers, Eur. J. Biochem., 1997, 247:136-141). Da das Mcm3 und die anderen Mitglieder der Mcm-Familie eine so grundlegende Funktion im Zellzyklus besitzen, sind Nachweissysteme, bevorzugt immunbiochemische- und immunhistologische Nachweise, wünschenswert. Solche Nachweise sind von Nöten, da damit neue Parameter zur medizinischen Diagnostik, bevorzugt der Krebsdiagnostik, gewonnen werden können.

Es ist bekannt, daß das humane Mcm3 Protein im Kaninchen immunogen wirkt (Thommes et al., Nucleic Acid Res., 1992, 20:1069-1074). Die bekannten polyklonalen Antiseren reagieren aber entweder in immunbiochemischen Analysen (Western Blot) nicht monospezifisch und/oder sind nicht in der Routine-Immunhistologie schnell und unproblematisch einsetzbar. Somit steht derzeit kein Werkzeug zur Verfügung, das als Nachweisverfahren für Mcm3 in der medizinischen Diagnostik dienen kann.

#### **Darstellung der Erfindung**

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereit zustellen, das Mcm3 Protein in biochemischen als auch in histologischen Systemen, einzeln oder in Kombination miteinander durchgeführt, schnell und monospezifisch nachweist. Dieser Nachweis kann einzeln oder in Kombination mit anderen bekannten Markern durchgeführt werden.

Erfindungsgemäß wird dies durch einen monoklonalen Antikörper erreicht, der gegen das Mcm3 Protein gerichtet ist und sowohl in immunbiochemischen als auch in immunhistochemischen Nachweissystemen einsetzbar ist, wobei diese Nachweise einzeln oder in Kombination miteinander durchgeführt werden können.

Der monoklonale Antikörper kann aus jeglichem Tier oder dem Mensch erhalten sein, wobei monoklonale Antikörper aus der Maus bevorzugt sind.

Der monoklonale Antikörper kann ferner biochemisch, molekularbiologisch verändert oder synthetisch sein, wobei dem Antikörper ggf. Teile, die für die Erkennung des Mcm3 nicht notwendig sind, ganz oder teilweise fehlen bzw. diese Teile durch andere ersetzt sind, die dem Antikörper weitere günstige Eigenschaften verleihen.

Eine Hybridomzelllinie, einen bevorzugten monoklonalen Antikörper der vorliegenden Erfindung produzierend, nämlich ein monoklonaler Maus-Antikörper mit vorstehender Erkennung, wurde bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig unter der Nummer DSM ACC2388 am 16.02.1999 hinterlegt.

Erfindungsgemäße monoklonale Antikörper können mit der weiter unten beschriebenen, initialen Screeningstrategie hergestellt werden. Da eine Vielzahl der präparierten Hybridome entweder nicht monospezifisch gegen Mcm3 Protein sind oder aber nur in immunbiochemischen Nachweissystemen aber nicht in immunhistologischen Systemen und vice versa einsetzbar sind, erfordert die initiale Untersuchung der generierten Hybridomzellen diese Strategie, um erfindungsgemäße monoklonale Antikörper zu produzieren, die beide Eigenschaften aufweisen.

Zur Herstellung von molekularbiologisch veränderten und/oder synthetischen Antikörpern, die die erfindungsgemäßen Eigenschaften aufweisen, kann z.B. von vorstehend erhaltenen, monoklonalen Antikörpern ausgegangen werden. Hierzu bietet sich an, die Mcm3-Bindungsregionen der monoklonalen Antikörper zu analysieren und die für vorstehende Erkennung notwendigen und nicht notwendigen Teile zu identifizieren. Die notwendigen Teile können dann modifiziert und die nicht notwendigen Teile ganz oder teilweise eliminiert bzw. durch Teile ersetzt werden, die den Antikörpern weitere günstige Eigenschaften verleihen. Auch können Teile außerhalb der Bindungsregionen der Antikörper modifiziert, eliminiert oder ersetzt werden. Dem Fachmann ist

bekannt, daß sich für vorstehende Maßnahmen insbesondere die DNA-Rekombinationstechnologie eignet.

Erfindungsgemäße monoklonale Antikörper zeichnen sich dadurch aus, daß sie Mcm3 sowohl in biochemischen als auch in histologischen Nachweissystemen monospezifisch erkennen. Die Antikörper eignen sich somit zum schnellen Nachweis einer Mcm3 Expression in verschiedensten Proben.

Durch diese Eigenschaften eignen sich die erfindungsmäßigen Antikörper hervorragend zum Einsatz bei diagnostischen Fragestellungen, in denen vergleichend die gewebstopologische Verteilungsanalyse, z.B. mittels Immunhistochemie ermittelt, mit quantitativen Expressionsparametern, z.B. erhalten durch Western Blot oder Immunpräzipitation, analysiert werden sollen.

Mit den erfindungsgemäßen Antikörpern kann der monospezifische Nachweis der Mcm3 Expression auch in einzeln durchgeführten immunbiochemischen Nachweisverfahren, wie z.B. ELISA, Western Blot und Immunpräzipitation, bevorzugt hierbei der Western Blot, oder immunhistochemischen Geweben, bevorzugt an routinemäßig fixiertem und Paraffin eingebetteten Geweben, sicher erfolgen. Hierzu können die erfindungsgemäßen Antikörper, wenn es angebracht ist, markiert sein oder in Kombination mit markierten gegen sie gerichtete Antikörper oder andere Reagenzien eingesetzt werden. Diese Markierung kann sowohl mit radioaktiven, fluoreszierenden oder biotinylierten Stoffen oder anderen, dem Fachmann bekannten Markierungsstoffen, wie Digoxigenin oder Enzymen, wie Peroxidase oder alkalischer Phosphatase, erfolgen.

Erfindungsgemäße monoklonale Antikörper können *in vivo* den Einbau von DNA-Vorläufern inhibieren und somit Zellproliferation inhibieren. Daher eignen sich diese Antikörper, oder die oben genannten Derivate derselben zur Therapie von Krankheitszuständen, die mit erhöhter Zellproliferation einhergehen. Beispiele solcher

## Beispiele

### Beispiel 1

#### Western-Blot Analyse von Zell-Lysaten mit polyklonalen Kaninchen Anti-Mcm3 Antikörpern und erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörpern.

Zellysate der Zelllinie HELA wurden einer Sodiumdodecylsulphat-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS PAGE) unterzogen. Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden in einer Naßblotkammer über Nacht auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Diese wurde dann mit einem verdünnten Kaninchen Anti Mcm3 Antiserum (0,15  $\mu$ g/ml) 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit PBS (0,05% Tween 20, 0,5% Gelatine) wurde ein käuflicher alkalische Phosphatase- gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (Verdünnung nach Angabe des Herstellers, Dianova, Hamburg 1:10000) zugegeben. Nach 1 stündiger Inkubation bei Raumtemperatur und erneutem Waschen in TNT-Puffer erfolgte der Nachweis nach der Chemilumineszenzmethode mit dem ECL System (Amersham Life Science, Braunschweig) nach der Vorschrift des Herstellers.

Es zeigte sich, daß der polyklonale Anti-Mcm3 Kaninchen Antikörper neben der erwarteten prominenten Hauptproteinbande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 105 kD weitere Proteine im Molekulargewichtsbereich zwischen 50kD und 90kD zur Darstellung brachte.

Der erfindungsgemäße monoklonale Anti-Mcm3 Antikörper zeigte nur die erwartete Proteinbande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 105 kD auf.



## Beispiel 2

### Herstellung von erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörpern

Zur Immunisierung wurden Mäuse verwendet. Als Antigen diente rekombinantes humanes Mcm3 Protein.

#### Immunisierungs- und Fusionsprotokoll

Tag 1: 100 mg Mcm3 Protein in 100 ml PBS (phosphate buffered saline) wurden mit 100ml Freund's Adjuvans komplett sorgfältig vermischt und anschließend einer Maus injiziert.

Tag 14: 50 mg Mcm3 Protein in 100 ml PBS wurden mit 100ml Freund's Adjuvans komplett sorgfältig vermischt und anschließend einer Maus injiziert.

Tag 21: 50 mg Mcm3 Protein in 100 ml PBS wurden mit 100 ml Freund's Adjuvans komplett sorgfältig vermischt und anschließend einer Maus injiziert.

Tag 37: 50 mg Mcm3 Protein in 100 ml PBS wurden mit 100 ml Freund's Adjuvans komplett sorgfältig vermischt und anschließend einer Maus injiziert.

Am Tag 39 wurde die Maus schmerzfrei getötet. Milzzellen wurden ihr entnommen und mit Myelomzellen fusioniert. Es wurden ausgewachsene Hybridome erhalten.

#### Screening der Hybridomüberstände und Klonierung

Überstände der ausgewachsenen Hybridome wurden zunächst in einem Spot-Blot-Assay getestet. Dazu wurde 1ml rekombinantes humanes Mcm3 in PBS (2 ng/ml) auf 1 cm x 0,5 cm große Nitrozellulose Membranstücken aufgebracht. Diese werden in eine 48 Well-Platte gelegt und 15 min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wird 45 min bei Raumtemperatur mit Blockierungspuffer (PBS, 0,005 Tween 20, 4% Gelatine)

inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit PBS (0,05% Tween 20, 0,5% Gelatine) wurde mit den Hybridomüberständen 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit PBS (0,05% Tween 20, 0,5% Gelatine) wurde ein käuflicher alkalische Phosphatase- gekoppelter Ziege-anti-Maus Antikörper, Dianova, Hamburg (Verdünnung nach Angabe des Herstellers 1:10000) zugegeben. Nach 1 stündiger Inkubation bei Raumtemperatur mit PBS (0,005% Tween 20, 0,5% Gelatine) erfolgte die alkalische Phosphatase Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36 mM 5'Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat; 400 mM Nitroblau-terazolium, 100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) bei Raumtemperatur für 10 min.

Die im Spot-Blot positiven Hybridomüberstände wurden anschließend immunhistologisch getestet. Dazu wurden Paraffinschnitte, z. B. Tonsille, nach Standardmethoden rehydriert (2 x 100% Xylol, 2 x 100 % EtOH, 2 x 70 % EtOH, 2 x 40 % EtOH), anschließend kurz in Wasser gespült. Die Schnitte wurden dann in Citratpuffer pH 6 (2,1 g Citronensäure-monohydrat auf 1l, mit 2N NaOH auf pH 6 einstellen) in einem Dampfdruckkochtopf 1-5 min gekocht. Nach Öffnen des Topfes wurden die Schnitte sofort in kaltem (RT) TBS gewaschen, anschließend mit Hybridomüberständen in einer feuchten Kammer 30 min inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in TBS wurden am Schnitt gebundene Antikörper mittels der indirekten Immunperoxydase-Methode detektiert, mit Hämalaun gegengefärbt, eingebettet und mikroskopisch ausgewertet.

Die sowohl im Spot-Blot als auch in der Immunhistologie positiven Hybridome wurden bis zur Monoklonalität kloniert und rekloniert. Es wurden unabhängige monoklonale Antikörper erhalten. Eine Hybridomzelllinie, die einen erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper produziert, wurde bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig unter der Nummer DSM ACC2388 am 16.02.1999 hinterlegt.

### Beispiel 3

#### Immunpräzipitation mit erfindungsgemäßen Anti-Mcm3 Antikörpern

Zu 10  $\mu$ l Dynalbeads (Dynal M280 Schaf-anti-Maus, Dynal, Hamburg) wird 1  $\mu$ g anti-Mcm3 Primärantikörper gegeben und für 30 min bei 4°C unter rollen inkubiert.

Zellpräparate (1\*10<sup>6</sup> Zellen) werden in Immunpräzipitationspuffer (18 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,3% Hexadecylmethyl-ammoniumbromid, 5 mM EDTA und 1 mM DTT) Proteaseinhibitoren enthaltend aufgenommen, 5 min aufgekocht, auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (5 min, 14000 U/min). Der Überstand wird zu dem Komplex aus Dynalbeads/Primärantikörper gegeben und bei 4°C für 30 min auf einem Roller inkubiert. Anschließend wird das Gefäß in ein Dynal magnetic concentrator gestellt, 20 sec gewartet und der Überstand abgenommen. Die Magnetbeads werden in 500  $\mu$ l NET (Tris/HCl 18 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5mM, DTT 1mM) resuspendiert, wieder in den magnetic concentrator gestellt und der Überstand nach 20 sec entfernt. So werden die Beads mehrfach gewaschen.

Das so aufgereinigte Mcm3 kann dann mit Hilfe einer SDS-PAGE analysiert werden.

### Beispiel 4

#### Mikroinjektion erfindungsgemäßer Anti-Mcm3 Antikörper in Zellkerne permanenter Zelllinien-Zellen

Für die Mikroinjektion wurden HEp-2 auf CELLLocate® Deckgläschen kultiviert und in logarithmischer Wachstumsphase verwendet. Unter lichtmikroskopischer Kontrolle wurden erfindungsgemäße Anti-Mcm3-Antikörper, bzw. ein irrelevanter Kontrollantikörper, mit einem Transjektor und Mikromanipulator in die Zellkerne mikroinjiziert (Injektionsdruck 130 hPa; Injektionszeit zwischen 3 und 5 sec.). Die injizierten Zellen

wurden dann 6 Stunden mit Bromodesoxyuridin (BrdU)-haltigem (0,1 mM) Medium kultiviert. Nach dem Fixieren (5 min 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur) wurden die Deckgläschen dreimal in Tris-gepufferter Saline (TBS) gewaschen, 10 min in 100 % EtOH bei -20°C inkubiert und anschließend die anhaftenden Zellen durch direkte Überführung in 0,1% Triton X-100 TBS 10 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Die injizierten Antikörper wurden dann mit einem käuflichen Cy3 gekoppeltem Ziege anti Maus Antikörper, Dianova, Hamburg (Verdünnung nach Angabe des Herstellers in PBS/10% bovines Serum Albumin) detektiert. Zum Nachweis des in die Zellen eingebauten BrdU wurden die Präparate zunächst 60 min in 2M HCl bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Präparate mehrfach zunächst mit Aqua dest., dann zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde mit einem käuflichen FITC- markierten anti BrdU Antikörper, Boehringer Mannheim, Mannheim (Verdünnung nach Angabe der Hersteller) über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Präparate intensiv fünfmal 10 min in PBS gewaschen, mit DABCO (1,4-Diazabicyclo[2,2,2] octan) eingedeckt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

Es zeigte sich, daß fast alle mit Kontrollantikörpern injizierten Zellen auch BrdU eingebaut hatten, also unter dem Experiment den Zellzyklus regulär durchliefen. Dagegen hatten nur zwischen 20% und 50% der Zellen, die mit erfindungsgemäßen anti-Mcm3-Antikörpern injiziert worden waren, einen Einbau von BrdU. Die Proliferation dieser Zellen wurde also durch die erfindungsgemäßen Antikörper inhibiert.

# P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Monoklonaler Antikörper, der humanes Mcm3 sowohl immunhistologisch als auch immunbiochemisch monospezifisch erkennt und bindet.
2. Monoklonaler Antikörper, der humanes Mcm3 sowohl immunhistologisch als auch immunbiochemisch monospezifisch erkennt und bindet, wobei dieser monoklonale Antikörper Eigenschaften wie der monoklonale Antikörper aus der Hybridomzelllinie mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC2388 aufweist.
3. Monoklonaler Antikörper, der humanes Mcm3 sowohl immunhistologisch als auch immunbiochemisch monospezifisch erkennt und bindet, wobei das Epitop von dem monoklonalen Antikörper aus der Hybridomzelllinie mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC2388 erkannt wird.
4. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1, wobei der monoklonale Antikörper biochemisch oder molekularbiologisch verändert oder synthetisch sein kann, wobei dem Antikörper ggf. Teile, die für die Erkennung des Mcm3 nicht notwendig sind, ganz oder teilweise fehlen bzw. diese Teile durch andere ersetzt sind, die dem Antikörper weitere günstige Eigenschaften verleihen.
5. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1, der von der Hybridomzelllinie mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC2388 produziert.
6. Hybridomzelllinie, die einen monoklonalen Antikörper exprimiert, der humanes Mcm 3 sowohl immunhistologisch als auch immunbiochemisch spezifisch erkennt und bindet.

7. Hybridomzelllinie nach Anspruch 6, wobei die Hybridomzelllinie die Zelllinie mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC2388 ist.
8. Verwendung des monoklonalen Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 5 in einem Nachweisverfahren für humanes Mcm3.
9. Verwendung des monoklonalen Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zur immunhistologischen, immuncytologischen oder immunbiochemischen Detektion von humanem Mcm3 in einer Probe.
10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe ausgewählt wird aus der Gruppe Serum, Sputum, Urin und Liquor.
11. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die Probe Gewebe ist.
12. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die immunbiochemische Detektion die Verfahren ELISA, RIA, Western Blot, Far Western Blot, Immunpräzipitation und affinitätschromatographische Schritte umfasst.
13. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die immuncytologischen Methoden FACS und MACS umfassen.
14. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die immunhistochemische Detektion Fluoreszenz, radioaktive, enzymatische und Chemilumineszenz-Methoden umfasst.
15. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass ein Tier mit humanem Mcm3 immunisiert wird, und monoklonale Antikörper nach Fusion von Milzzellen des Tieres mit Myelomzellen erhalten werden, umfassend die Schritte:

- (i) initiales Screening der Hybridome mit Hilfe eines immunbiochemischen Verfahrens
  - (ii) Screenen der im Schritt (i) positiven Hybridome mit Hilfe eines immunhistochemischen Verfahrens.
16. Verfahren zur Herstellung von gereinigtem humanen Mcm3, dadurch gekennzeichnet, daß ein monoklonaler Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 5 verwendet wird.
  17. Verfahren zur Herstellung von gereinigtem humanen Mcm3, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren einen Affinitätschromatographieschritt mit monoklonalen Antikörpern gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 umfasst.
  18. Verfahren zur Herstellung von gereinigtem humanen Mcm3, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren einen Immunpräzipitationsschritt mit einem monoklonalem Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 umfasst.
  19. Diagnostische Zusammensetzung enthaltend einen monoklonalen Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5.
  20. Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Herstellung eines Präparats zur Behandlung von Tumoren, Allergien, Autoimmunerkrankungen, Narbenbildung, Entzündungen und rheumatischen Erkrankungen sowie der Unterdrückung von Abwehrreaktionen bei Transplantationen.
  21. Arzneimittel enthaltend monoklonale Antikörper gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 zusammen mit pharmazeutisch akzeptablen Hilfsstoffen.

### **Zusammenfassung**

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf monoklonale Antikörper gegen das humane Mcm3 Protein, Hybridomzelllinien, die solche Antikörper produzieren, Verfahren zur Herstellung und ihre Verwendung.

Erfindungsgemäße monoklonale Antikörper erkennen und binden humanes Mcm3 monospezifisch, sowohl in immunhistologischen als auch in immunbiochemischen Nachweissystemen.

Verfahren zur Herstellung dieser monoklonalen Antikörper beinhaltet ein initiales Screening der Hybridomüberstände mit immunbiochemischen Methoden und darauf folgend ein zweites Screenen der positiven Hybridome mit Hilfe eines immunhistochemischen Verfahrens.